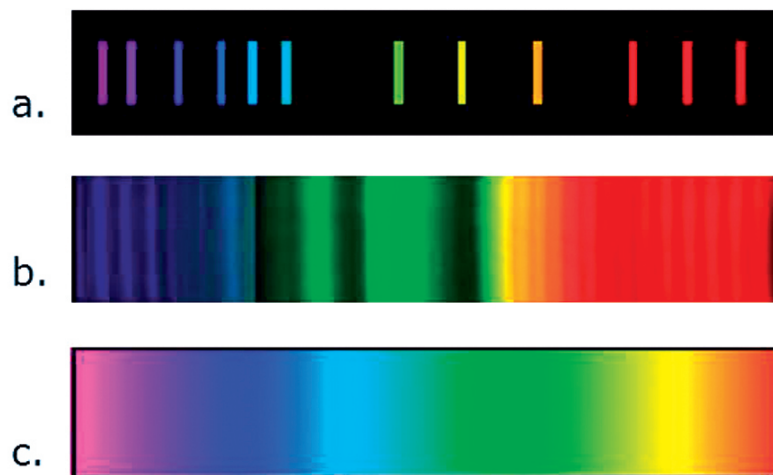


**Trakasti (diskretni) spektri** (slika 5b) potiču od emisije molekula i složeniji su od atomskih spektara zbog složene strukture molekula. Sastoje se od grupa linija, pri čemu svaka linija odgovara jednom rotacionom prelazu. Serija bliskih linija obrazuje jednu traku koja odgovara jednom vibracionom prelazu, tj. nizu rotacionih prelaza. Sistem traka odgovara jednom elektronskom prelazu, tj. nizu vibracionih prelaza u molekulu.



**Slika 5.**

Spektri: a) linijski  
 b) trakasti  
 c) kontinualni

<sup>28</sup> Kontinualno zračenje predstavlja zračenje koje sadrži sve talasne dužine vidljivog dela spektra.

<sup>29</sup> *Wilhelm Wien* (Vilhelm Vin, 1864–1928), nemački fizičar. Dobitnik je Nobelove nagrade za fiziku 1911. godine, za otkriće Zakona zračenja crnog tela.

**Kontinualni<sup>28</sup> (nekarakteristični) spektri** nastaju pri zračenju usijanih čvrstih tela i gasova na visokom pritisku, kao posledica toplotnog pobuđivanja atoma. Usled sudara atoma, linije se šire dajući kontinuum (slika 5c). Spektralni sastav toplotnog zračenja (raspodela zračenja po talasnim dužinama) zavisi od temperature. S porastom temperature emitovano zračenje sadrži, u većem udelu, svetlost manjih talasnih dužina. Talasna dužina koja ima najintenzivnije zračenje  $\lambda_{max}$  obrnuto je proporcionalana apsolutnoj temperaturi (*Vinov<sup>29</sup> zakon pomeranja*):

$$\lambda_{max} = \frac{k}{T} \quad (7)$$

gde je  $k$  – Vinova konstanta ( $2,897 \times 10^{-3}$  m K) i  $T$  – temperatura u stepenima Kelvina.

## Šta je UV-VIS apsorpciona spektrometrija?

Ultravioletna-vidljiva (UV-VIS) apsorpciona spektrometrija, ili UV-VIS molekulska apsorpciona spektrometrija, obuhvata metode kojima se analiziraju apsorpcioni spektri koji potiču od elektronskih prelaza u molekulu. Zato se naziva i elektronska spektroskopija.

Kako su energetske razlike između elektronskih stanja molekula reda veličine  $1\text{--}10\text{ eV}^1$ , to se pri prelazu između ovih stanja, apsorbuje ili emituje svetlost čije se talasne dužine nalaze u ultravioletnoj (UV) oblasti (100–380 nm) i vidljivoj (VIS) oblasti (380–780 nm) spektra.

Metode UV-VIS molekulske apsorpcione spektrometrije su *fotometrija* i *spektrofotometrija*.

$$^1 1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J.}$$

## Kratak istorijat

Najvažnija otkrića i godine koje su obeležile razvoj spektroskopskih metoda generalno, a samim tim i UV-VIS spektroskopije, date su u poglavlju 1. Od Njutnovog (*Sir Isaac Newton*) otkrića spektra (1666) čiji je samo jedan mali deo vidljivo zračenje, prošlo je skoro sto pedeset godina do otkrića zračenja nevidljivih za ljudsko oko. Infracrveno zračenje otkrio je Heršel (*William Herschel*) 1800. godine (poglavljje 2.2), a godinu dana kasnije, Riter (*Johann Wilhelm Ritter*) otkrio je ultravioletno zračenje. Ovaj fizičar i hemičar eksperimentalno je dokazao da »nevidljivi« zraci na samom kraju ljubičastog dela VIS spektra izazivaju jače zacrnjenje papira natopljenog srebrohloridom od zračenja iz VIS dela spektra. Da bi naglasio njihovu izuzetnu hemijsku reaktivnost nazvao ih je »deoksidirajući zraci«, tj. »hemijski zraci«, koji su kasnije nazvani ultravioletni (prefiks *ultra* na latinskom znači izvan<sup>2</sup>).

Identifikacija supstanci na osnovu njihove boje predstavlja najraniji primer kvalitativne apsorpcione spektroskopske analize, a prvo zapažanje da intenzitet boje može biti indikator koncentracije, predstavlja najraniju primenu metode za kvantitativnu analizu. Prva merenja izvođena su korišćenjem sunčeve svetlosti, ili lampe, kao izvora upadnog zračenja i vizuelnim posmatranjem spektra.

<sup>2</sup> *Ultra* znači i iznad, krajnji, radikalan.

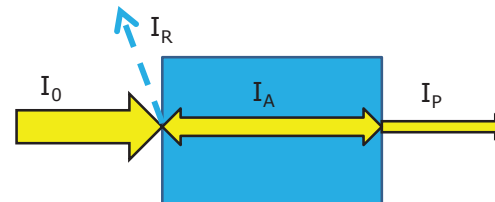
$$I_0 = I_A + I_R + I_P \quad (2)$$

Deljenjem izraza 1 sa  $I_0$ , dobija se:

$$1 = \frac{I_A}{I_0} + \frac{I_R}{I_0} + \frac{I_P}{I_0} \quad (3)$$

gde prvi, drugi i treći član predstavljaju apsorpcionu, refleksionu i transparentnu moć providnog tela (slika 9).

Neapsorbovani deo kontinualnog spektra zračenja, tj. onaj deo koji je propušten i koji je komplementaran apsorbovanom delu bele svetlosti (VIS deo spektra) određuje *boju* supstance (koju vidi oko). Oko ne vidi *spektralnu boju* (boja apsorbovanog zračenja), već *komplementarnu* (reflektovanu) boju. Znači, **boja** (komplementarna) jeste vizuelni utisak koji se stvara u oku, a javlja se kao posledica selektivne apsorpcije svetlosti odgovarajućih talasnih dužina upadne svetlosti (slika 10).



**Slika 9.**

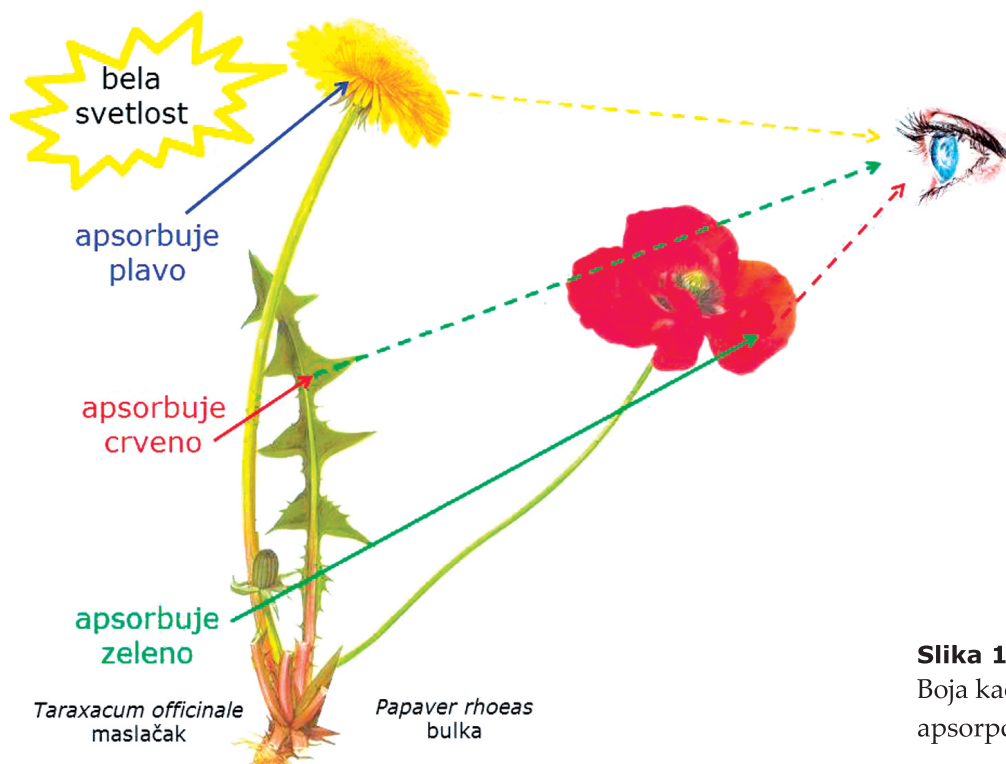
Raspodela upadne svetlosti pri prolasku svetlosnog zraka kroz providnu sredinu

$I_0$  – intenzitet upadne svetlosti

$I_R$  – intenzitet reflektovane svetlosti

$I_A$  – intenzitet apsorbovane svetlosti

$I_P$  – intenzitet propuštene svetlosti



**Slika 10.**

Boja kao posledica selektivne apsorpcije svetlosti

## 9.1. TEORIJSKE OSNOVE

<sup>7</sup> John Frederic Daniell (Džon Frederik Denijel, 1790–1845), engleski hemičar i meteorolog. Pored električne baterije (danas poznate kao *Denijelov spreg*) osmislio je i higrometar (instrument za merenje vlažnosti gasova).

### Slika 1.

Denijelov spreg

a) hemijske reakcije na elektrodama galvanskog sprega

b) promene na elektrodama

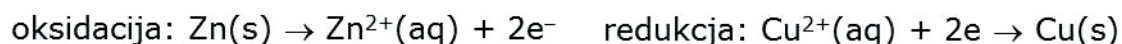
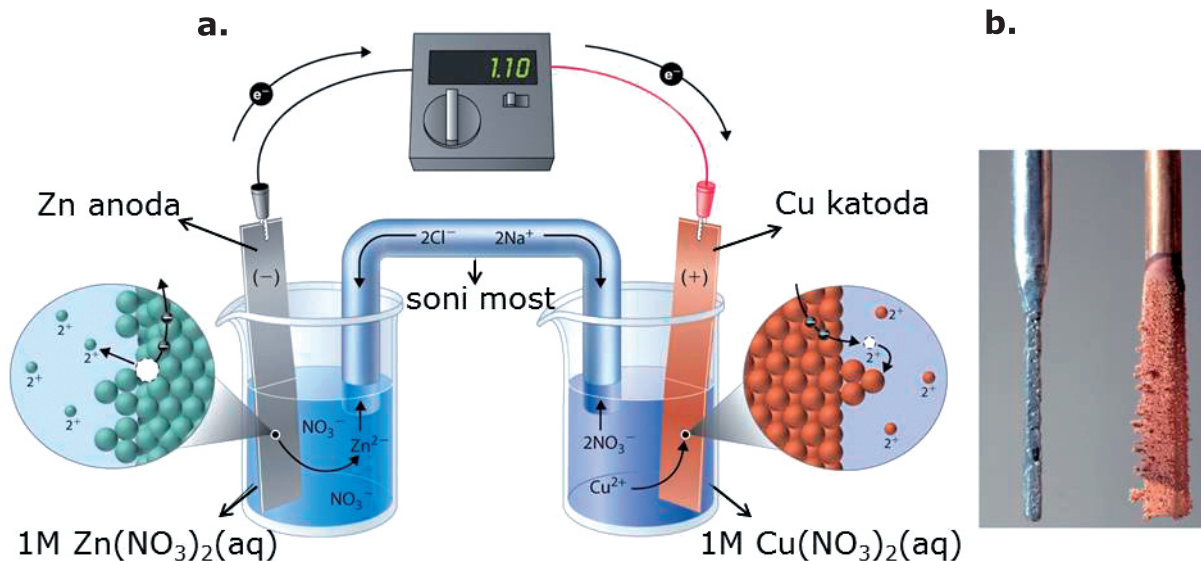
Dobijeno ljubaznošću Dr Brucea Averilla<sup>8</sup>

<sup>8</sup> Averill, A.B., Eldredge, P.: *Principles of General Chemistry*, Chapter 19 Electrochemistry, elektronska verzija.

Potencimetrija je oblast elektrohemije koja se bavi proučavanjem tzv. galvanskog dobijanja električne energije, tj. pretvaranjem hemijske energije galvanskog sprega u električnu energiju.

**Galvanski spreg** (poglavlje 7) dobija se kada se električno kolo elektrohemijske ćelije (sistem koji se formira kombinacijom provodnika I i II vrste, tj. elektronskih i jonskih provodnika) zatvori preko metalnog provodnika. Galvanski spreg (galvanska ćelija) je izvor električne energije s obzirom na to da se hemijske reakcije u ćeliji odigravaju spontano i da se slobodna energija hemijske reakcije pretvara u električnu energiju.

Primer galvanske ćelije jeste **Denijelov** (*John Frederic Daniell*<sup>7</sup>) **spreg** (slika 1). Sastoji se iz dve polućelije razdvojene elektrolitičkim mostom ili polupropustljivom (semipermeabilnom) membranom. U jednoj polućeliji nalazi se pločica cinka uronjena u rastvor cink(II)-sulfata, a u drugoj pločica bakra uronjena u rastvor bakar(II)-sulfata.



<sup>6</sup> *Adolf Eugen Fick* (Adolf Eugen Fik, 1829–1901), nemački lekar.

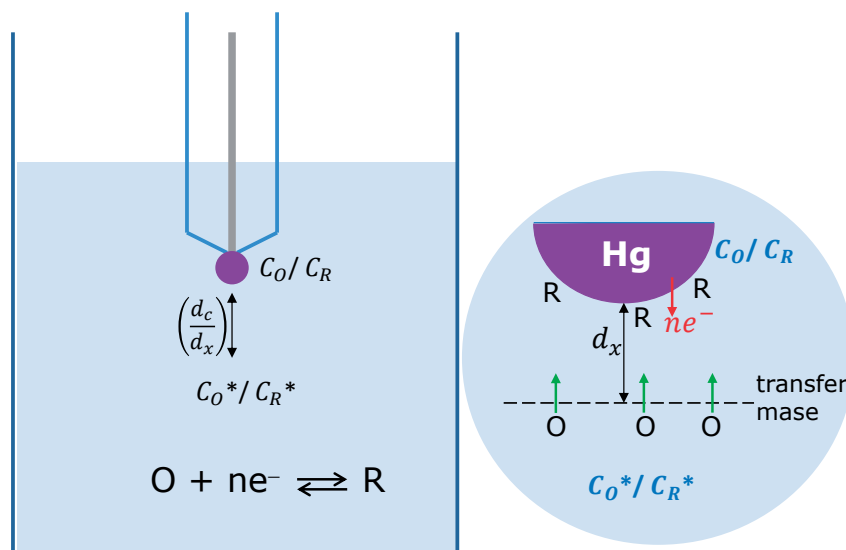
U graničnom slučaju, kada je struja kontrolisana samo difuzijom, tj. postojanjem gradijenta koncentracije u neposrednoj okolini elektrode, jačina difuzione struje  $I$ , izražena preko gradijenta koncentracije oksidovane vrste O (slika 1), može se izvesti iz prvog Fikovog zakona difuzije (*Adolf Fick*<sup>6</sup>), i data je izrazom:

$$I = n \cdot F \cdot D_O \cdot A \frac{dc_O}{dx} \quad (3)$$

gde je:  $D_O$  – difuzioni koeficijent oksidovane vrste,  $A$  – površina elektrode i  $dc_O/dx$  – promena koncentracije oksidovane vrste na rastojanju  $x$  od površine elektrode.

**Slika 1.**

Elektrohemijski proces kontrolisan difuzijom: prenos (transfer) mase usled gradijenta koncentracije



Izraz 3 može se transformisati u izraz:

$$I = n \cdot F \cdot D_O \cdot A \cdot \frac{c_O^* - c_O}{\delta_O} \quad (4)$$

gde su:  $c_O^*$  i  $c_O$  – koncentracija oksidovane vrste u unutrašnjosti rastvora i na površini elektrode, i  $\delta_O$  – debljina difuzionog sloja koja predstavlja rastojanje od površine elektrode do koje se, nasuprot termičkoj konvekciji tečnosti, može održati gradijent koncentracije iniciran procesom depolarizacije (na sobnoj temperaturi i u vodenim rastvorima iznosi približno  $10^{-4}$  cm).

# SEPARACIONE METODE



## HROMATOGRAFIJA

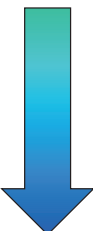
---

- TEORIJSKE OSNOVE
- HROMATOGRAFIJA NA RAVNOJ POVRŠINI
- HROMATOGRAFIJA U KOLONI
- TEČNA HROMATOGRAFIJA
  - TEČNA HROMATOGRAFIJA VELIKE MOĆI RAZDVAJANJA – HPLC
- TEČNA HROMATOGRAFIJA ULTRAVELIKE MOĆI RAZDVAJANJA – UHPLC
- GASNA HROMATOGRAFIJA
- HROMATOGRAFIJA POD SUPERKRITIČNIM USLOVIMA
  - HROMATOGRAFIJA SA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

## ELEKTROFOREZA

---

- TEORIJSKE OSNOVE
- KAPILARNA ELEKTROFOREZA

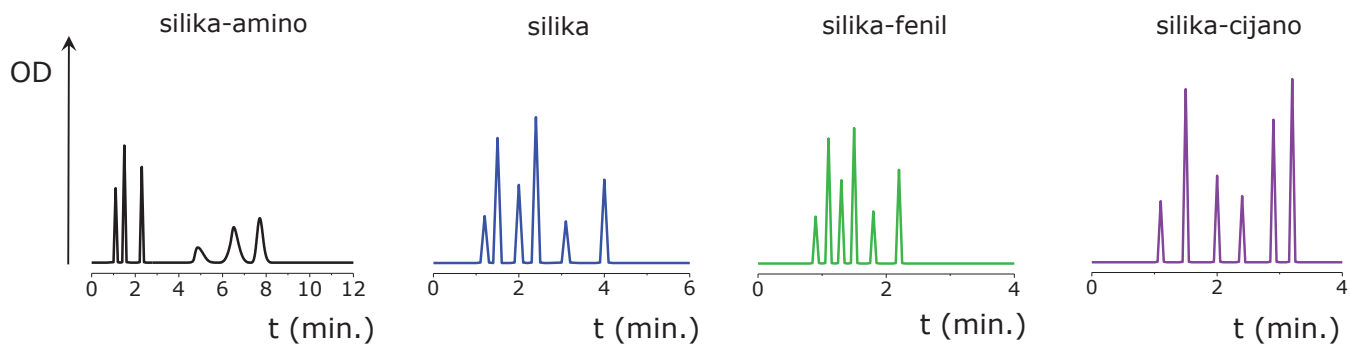
OSOBIINA	R	KOLONA
Polarna  Nepolarna	$\text{Si}-\text{Si}-\text{R}$ $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{Si} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Silika
	-OH	Silika
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	Silika-aminopropil
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CN	Silika-cijanopropil
	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Silika-fenil
	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -oktil-silika (C8)
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -oktadecil-silika (C18)	

Najpolarnija je tzv. silika kolona napunjena silikagelom koji ima slobodne silanolne grupe koje lako grade vodonične veze sa analitom. Koristi se u hromatografiji normalnih reverzних faza, kao i u adsorpcionoj HPLC. Silika- amino je, takođe, polarna stacionarna faza, jer gradi dipol-dipol, kao i vodonične veze. Silika-cijano pripada grupi semipolarnih stacionarnih faza jer, pored dipol-dipol veza, gradi i manje polarne veze. Koristi se u hromatografiji normalnih, kao i reverzних faza. Silika-fenil je nepolarna faza jer gradi  $\pi$ - $\pi$  veze. Na slici 11 prikazano je hromatografsko razdvajanje iste smeše na različitim kolonama, odnosno stacionarnim fazama.

**Tabela 2.**  
Stacionarne faze

**Slika 11.**  
Razdvajanje iste smeše komponenata na različitim kolonama u hromatografiji normalnih faza (NP-HPLC<sup>6</sup>)

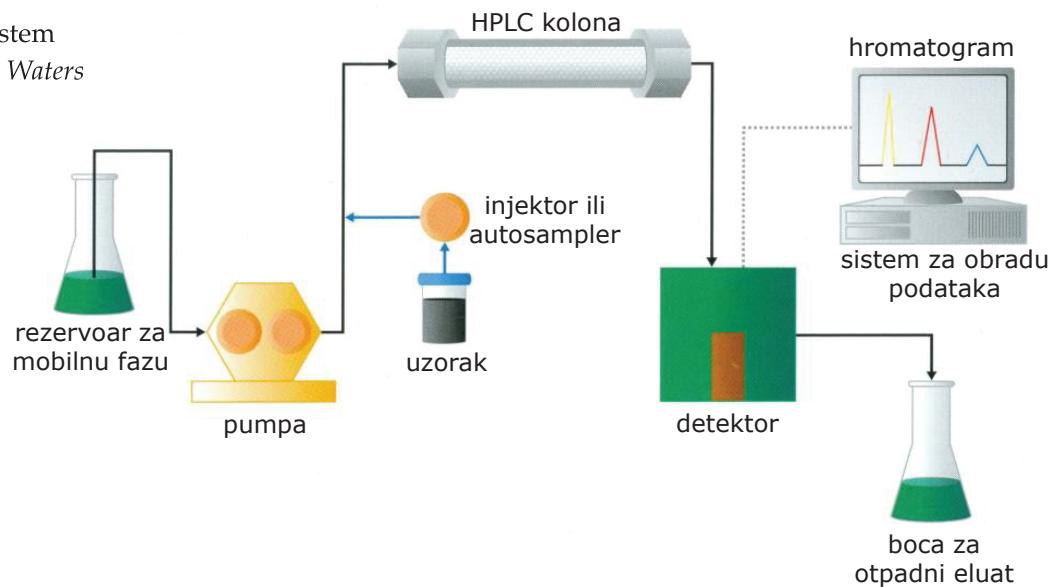
<sup>6</sup> Schwedt, G.: *Atlas de poche des méthodes d'analyse*, Médecine-Sciences Flammarion, Paris, 1993.



**Slika 31.**

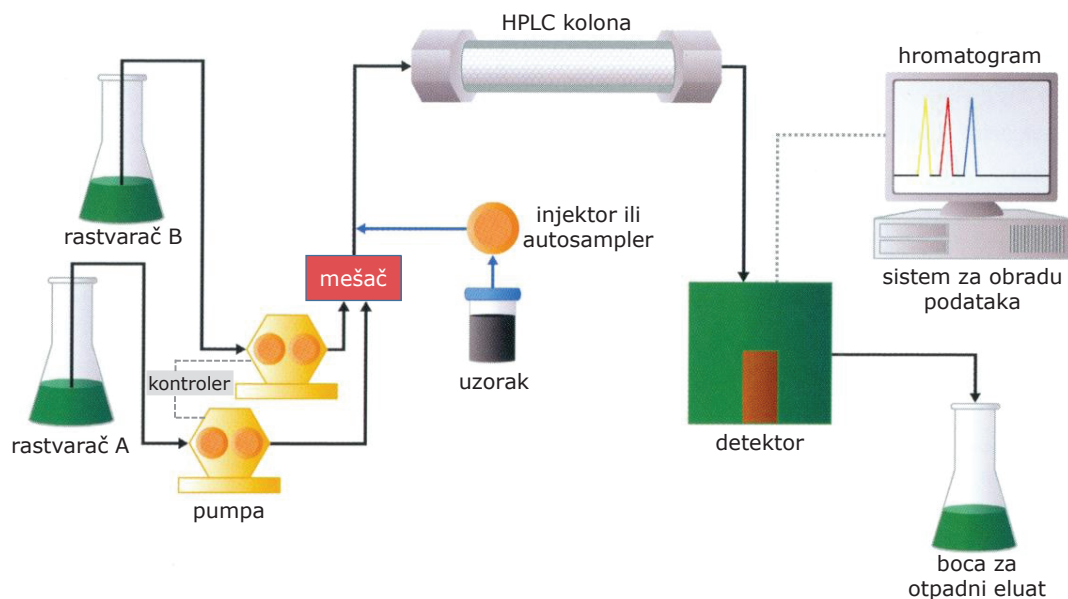
Izokratski hromatografski sistem

Preuzeto uz dozvolu kompanije Waters

**Slika 32.**

Gradijentni hromatografski sistem

Preuzeto uz dozvolu kompanije Waters

U zavisnosti od načina rada, tj. postizanja visokog pritiska, pumpe mogu biti *recipročne*, *ubrizgavajuće* i *pneumatske*.





*Tečna hromatografija ultravelike moći razdvajanja (Ultra High Performance Liquid Chromatography – UHPLC), tečna hromatografija pod ultravisokim pritiskom ili tečna hromatografija ultravisokih performansi, termini su koji se mogu naći u literaturi. To je HPLC tehnika s veoma poboljšanim karakteristikama. Jedna je od najsavremenijih HPLC tehnika koja se razvija poslednjih desetak godina. Često se za ovu metodu koristi akronim UPLC, pa tako i u ovom udžbeniku.*

Napredak UPLC tehnike, u odnosu na standardnu HPLC tehniku, ogleda se samo u poboljšanim karakteristikama kolone. Kako je efikasnost (izražena brojem teorijskih platoa  $N$ ) proporcionalna

*Waters UPLS-MS-MS*

Tečna stacionarna faza može biti naneta kao tanak film na unutrašnji zid kapilarne kolone (u literaturi poznata kao WCOT – *Wall Coated Open Tubular Column*) ili prevučena preko spraćenog inertnog nosača stacionarne faze (SCOT – *Support Coated Open Tubular Column*). Kapilarne kolone tipa WCOT je efikasnija u separaciji od SCOT, jer ima manji unutrašnji prečnik kapilare. Debljina sloja tečne stacionarne faze je 0,2–5  $\mu\text{m}$ . Noviji tip WCOT kolona su tzv. FSOT kolone (*Fused Silica Open Tubular Column*). Napravljene su od amorfne silikatne materijala bez oksida metala, čime je postignuta velika inertnost. Imaju tanje zidove kapilare i obložene su poliamidom, zbog čega su veoma fleksibilne. Tečna stacionarna faza ostvaruje hemijske veze sa silanolnim grupama čvrstog nosača silikata, a ne fizičke veze kako je to kod WCOT kolona. Kapilarne kolone, čiji je unutrašnji zid prevučen samo slojem čvrstog poroznog adsorbensa su tzv. PLOT kolone (*Porous Layer Open Tubular Column*). Može se smatrati da su kapilarne kolone tipa SCOT podgrupa kolona PLOT. U tabeli 1 date su osnovne karakteristike kapilarnih i pakovanih kolona.

**Tabela 1.**

Osnovne karakteristike kapilarnih i pakovanih kolona

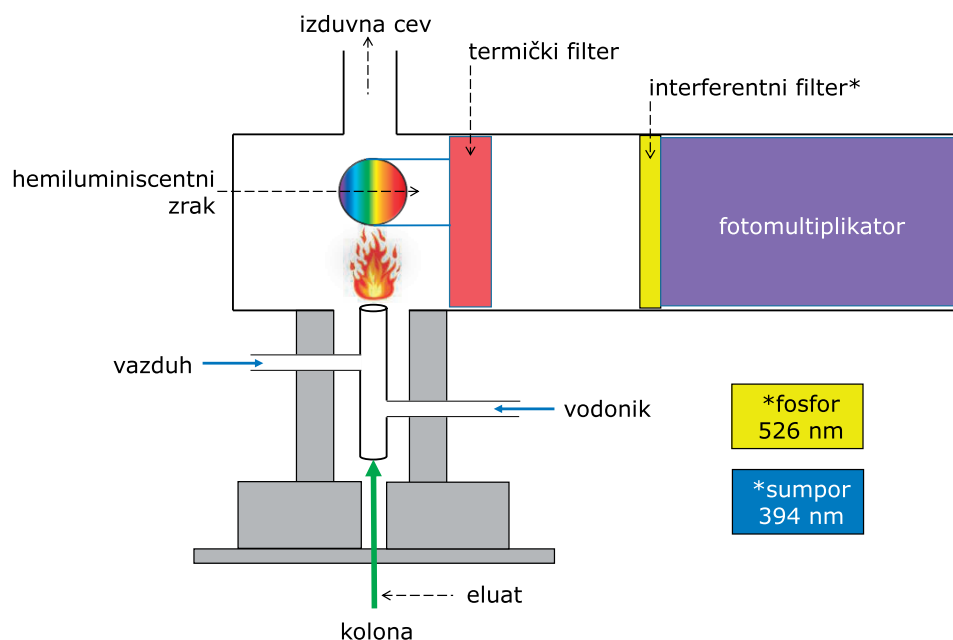
OSOBIINA	KOLONA			
	KAPILARNA			PAKOVANA
	FSOT	WCOT	SCOT	
Dužina (m)	10–100	10–100	10–100	1–6
Unutrašnji prečnik (mm)	0,1–0,53	0,25–0,75	0,5	2–4
Broj platoa $N$	$(20–400) \times 10^3$	$(10–400) \times 10^3$	$(6–120) \times 10^3$	$(1–10) \times 10^3$

Danas se uglavnom koriste kapilarne kolone, jer omogućavaju bolju separaciju, kao i bolju rezoluciju. Pokazuju veću osetljivost, vreme trajanja hromatografskog postupka je kraće, a za analizu su potrebne veoma male količine uzorka. Hromatografski pikovi su veoma uski i jasno definisani.

## PLAMENO–FOTOMETRIJSKI DETEKTOR

Plameno–fotometrijski detektor (*Flame Photometric Detector – FPD*) pripada specifičnim detektorima, jer daje odgovor samo na prisustvo isparljivih jedinjenja koja sadrže sumpor ili fosfor. To su razlozi zbog čega se najčešće koristi u analizi ovih jedinjenja.

Princip rada plameno–fotometrijskog detektora jeste ekscitacija u plamenu i merenje karakterističnog emitovanog zračenja (slika 26). Temperaturu redukcionog plamena obezbeđuje smeša vodonika i vazduha. U plamenu dolazi do ekscitacije molekula koji sadrže sumpor ili fosfor. Povratkom u osnovno stanje, molekuli emituju hemiluminiscentno zračenje karakteristične talasne dužine koja se propušta kroz odgovarajuće filtere. To su izmenljivi interferentni optički filteri koji omogućavaju propuštanje karakteristične talasne dužine (394 nm za sumpor i 526 nm za fosfor). Intenzitet emitovanog zračenja meri se osetljivim fotomultiplikatorom.



Kod plameno–fotometrijskog detektora, ispred interferentnih filtera postavlja se i tzv. termički filter čija je funkcija otklanjanje ometajućeg IR zračenja.

**Slika 26.** Šematski prikaz plameno–fotometrijskog detektora



УНИВЕРЗИТЕТ  
УТИЛА ПОМОЩ  
УСТРОЈАЊОМ  
ПОСРЕДСТВОМ

Један примерак  
универзитетског  
библиотекарства  
универзитета

Један примерак  
универзитетског  
библиотекарства  
универзитета